

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

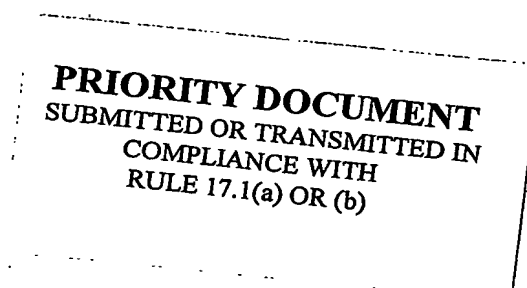
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
Invenzione Industriale N. MI2003 A 001909 del 03.10.2003**



Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.



Roma, li.....**26 LUG. 2004**.....

IL FUNZIONARIO

Elena Marinelli

Sig.ra E. MARINELLI

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **KERYOS SPA**
 Residenza **MILANO** codice _____
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **PISTOLESI Roberto ed altri** cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza **DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL**
 via **Galleria San Babila** n. **41 C** città **MILANO** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

LINEE CELLULARI DI MAMMIFERO MODIFICATE PER LA PRODUZIONE DI GLICOPROTEINE RICOMBINANTI.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **TONON Giancarlo** 3) **MONACO Lucia**
 2) **POZZUOLO Sabrina** 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____
 2) _____

G. CENTRO ADIUTATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **21** **PROV** n. pag. **21** riassunto con descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) **0** **PROV** n. tav. **2** disegno obbligatorio (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 3) **1** **RIS** **Dich. Sost.**
 Doc. 4) **0** **RIS** designazione inventore
 Doc. 5) **0** **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) **0** **RIS** autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro

=Duecentonovantuno/90=

obbligatorio

COMPILATO IL **03/10/2003**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

P. P. KERYOS SPA

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO** **MILANO**

codice **1515**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2003A 001909

Reg. A.

L'anno **DUEMILATRE**

, il giorno **TRE**

, del mese di **OTTOBRE**

Il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

M. CORTONREI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI 2003/001909

REG. A

DATA DI DEPOSITO

03/10/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

11/11/1111

D. TITOLO

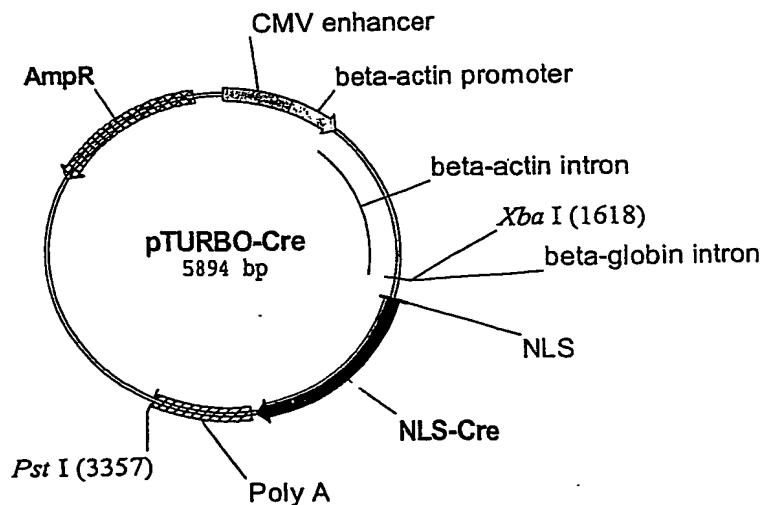
LINEE CELLULARI DI MAMMIFERO MODIFICATE PER LA PRODUZIONE DI GLICOPROTEINE RICOMBINANTI.

L. RIASSUNTO

Vengono scritte nuove linee cellulari di mammifero geneticamente modificate in grado di produrre glicoconjugati la cui porzione oligosaccaridica risulta più simile a quella umana rispetto ai medesimi glicoconjugati prodotti da cellule non modificate geneticamente. Le linee in questione possono essere utilizzate per la produzione di glicoconjugati ricombinanti di interesse terapeutico, in particolare per la produzione di glicoproteine da usarsi in terapia umana, in quanto i glicoconjugati prodotti in tali linee modificate risultano avere un minor potenziale immunogenico per l'uomo rispetto a quello dei corrispondenti glicoconjugati prodotti in cellule non modificate geneticamente.

M. DISEGNO

Figura 8



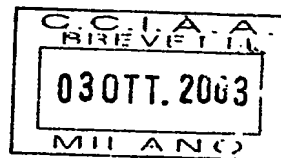
MP

MI 20031001909

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale a nome di Keryos Spa con sede a MILANO.

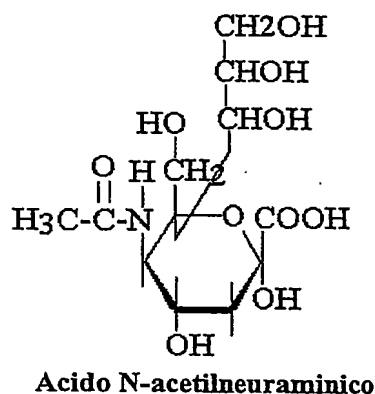
La presente invenzione si riferisce a nuove linee cellulari di mammifero geneticamente modificate. Le modificazioni si riferiscono a interventi di ingegneria genetica sul pathway metabolico di glicosilazione cellulare, volti a ridurre l'immunogenicità per l'uomo di glicoconiugati prodotti in sistemi eterologhi. Tali linee cellulari modificate possono essere utilizzate per la produzione di glicoconiugati da usarsi in terapia sull'uomo.

La glicosilazione delle proteine ne influenza un gran numero di proprietà. Complesse strutture oligosaccaridiche vengono legate a specifici residui di Asn (Asparagina) in un processo detto N-glicosilazione, che si svolge tra il Reticolo Endoplasmico (ER) e il sistema vescicolare del Golgi ed è presieduto da una batteria di enzimi quali glicosidasi e glicosiltransferasi. A livello della singola glicoproteina l'oligosaccaride influenza non solo l'attività biologica, il folding, la localizzazione e l'immunogenicità della molecola cui è legato ma ha altresì un profondo effetto sulle caratteristiche di adesione fra il glicoconiugato stesso e altre proteine, complessi macromolecolari o cellule. A livello sistemico tali strutture saccaridiche prendono parte a fenomeni di riconoscimento molecolare e/o cellulare durante lo sviluppo embrionale, in processi di infezione virale, in reazioni infiammatorie, nell'azione ormonale, in forme di artrite, nella risposta immunitaria, nella metastasi, solo per fare alcuni esempi. Diversi esempi di malattie genetiche umane associate a difetti nella maturazione di N-oligosaccaridi contribuiscono a testimoniare il ruolo essenziale di tali

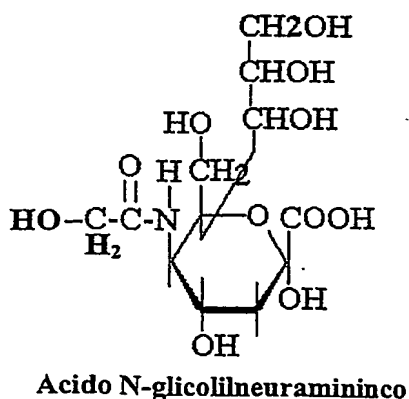


strutture glicaniche nello sviluppo e nella fisiologia animale (9).

Gli acidi sialici costituiscono una famiglia di circa 40 derivati dello zucchero a 9 atomi di carbonio denominato acido neuraminico. La forma non-sostituita dell'acido neuraminico in realtà non esiste in natura. Il gruppo amminico è generalmente acetilato a dare acido N-acetilneuraminico (Neu5Ac):



Neu5Ac rappresenta la forma più comune di acido sialico. Sostituendo uno degli atomi di idrogeno nella porzione metilica del gruppo acetilico con un gruppo ossidrilico si ottiene l'acido N-glicolilneuraminico: (Neu5Gc):



Neu5Gc è comune in molti tessuti animali ma è stato riscontrato nella specie umana solo in particolari forme di cancro.

Gli acidi sialici sono presenti praticamente in tutto il regno animale, dagli echinodermi agli umani. Essi hanno un ruolo importante a livello strutturale e svolgono importanti funzioni collegate a fenomeni di riconoscimento cellulare e molecolare. In virtù della posizione terminale e della carica negativa, essi fungono da protezione per la porzione subterminale della molecola o della cellula stessa ed è grazie alla repulsione fra le loro cariche negative che gli acidi sialici sono in grado di stabilizzare la corretta conformazione degli enzimi o delle proteine di membrana di cui fanno parte.

Per quanto riguarda i processi di riconoscimento, il sistema immunitario è in grado di distinguere strutture self da non-self anche grazie alla loro composizione in termini di acidi sialici. Essi sono componenti indispensabili di recettori per molecole quali ormoni e citochine; molti agenti patogeni quali tossine, virus, batteri e protozoi si legano ed invadono la cellula ospite per mezzo di recettori contenenti acidi sialici.

L'interesse nello sviluppo di processi per la produzione di proteine ricombinanti di interesse terapeutico in cellule animali ha dato luogo a notevoli progressi nella messa a punto di plasmidi d'espressione altamente efficienti. Meno significativi sono stati gli sforzi volti all'ottimizzazione delle linee cellulari d'espressione. Attualmente le cellule della linea CHO (Chinese Hamster Ovary) sono considerate ottime candidate come ospiti d'espressione in quanto facilmente manipolabili geneticamente, adattabili alla crescita in sospensione su larga scala e capaci di produrre glicoproteine

RP

le cui porzioni oligosaccaridiche sono assai simili, anche se non identiche, a quelle riscontrate nell'uomo. Sia le caratteristiche quantitative (glicosilazione incompleta) che qualitative (tipo di monosaccaridi aggiunti all'oligosaccaride e tipo di legame) sono importanti per le caratteristiche farmacocinetiche di glicoproteine da usarsi come agenti terapeutici. E' stato ad esempio dimostrato che, nel caso di glicoproteine le cui proprietà farmacocinetiche siano fortemente dipendenti dalla struttura della porzione saccaridica tipo N, insufficiente o scorretta sialilazione o galattosilazione possono dar luogo ad una clearance più rapida delle proteine stesse. A questo proposito Weikert S et al. (14) ingegnerizzano due linee di CHO, una esprimente stabilmente la glicoproteina TNFR-IgG (fusione fra Tissue Necrosis Factor Receptor e IgG1), una esprimente stabilmente la glicoproteina TNK-tPA (una variante del tissue Plasminogen Activator) per aumentare l'espressione di due enzimi già normalmente presenti in tali cellule: β 1,4-galattosiltransferasi (GT) e α 2,3-sialiltransferasi (ST). Essi ottengono in tal modo un processamento più completo delle porzioni terminali degli oligosaccaridi legati alle proteine TNFR-IgG TNK-tPA con conseguente rallentamento della clearance.

A livello qualitativo la glicosilazione in CHO presenta, rispetto a quella riscontrata in tessuti umani, due differenze sostanziali concernenti la sialilazione:

- 1- nell'uomo, oltre all'attività enzimatica α 2,3-Sialiltransferasi (α 2,3-ST) che si trova anche nelle cellule CHO, è presente l'attività enzimatica α 2,6-Sialiltransferasi (α 2,6-ST); in conseguenza di ciò, mentre glicani di origine umana possiedono acidi salici terminali



RP

legati al residuo subterminale mediante legami sia di tipo $\alpha 2,3$ che di tipo $\alpha 2,6$, nei glicani prodotti in CHO gli acidi salici sono legati unicamente mediante legami di tipo $\alpha 2,3$ (2);

- 2- Neu5Gc è prodotto dall'idrossilazione di Neu5Ac da parte dell'enzima CMP-NeuAc idrossilasi (CMAH) (EC1.14.13.45):

Nell'uomo il gene codificante tale attività enzimatica non è funzionale. In conseguenza di ciò NeuGc è assente in tessuti umani sani anche se ne sono state rilevate tracce in alcuni tumori. Glicoconiugati contenenti NeuGc sono quindi in grado di indurre nell'uomo una reazione immunitaria e causano la formazione di anticorpi detti di Hanganutziu-Deicher. Cellule CHO producono glicoproteine nelle quali NeuGc rappresenta circa il 3% degli acidi salici totali (7) ma la quantità di NeuGc presente nelle proteine ricombinanti può variare in funzione di fattori quali la natura della proteina espressa, il sito di inserzione del gene ricombinante entro il genoma dell'ospite, le condizioni di coltivazione delle cellule. E' documentata l'esistenza di cloni di CHO in cui il NeuAc è stato completamente sostituito da NeuGc (8).

Per quanto concerne la presenza in CHO dell'attività enzimatica CMP-NeuAc idrossilasi, essa è da ritenersi indesiderata dal punto di vista della produzione di glicoproteine ricombinanti da usarsi in terapia sull'uomo. Chenu S et al (3) hanno ottenuto una linea CHO priva della suddetta attività enzimatica. Essi hanno utilizzato la linea CHO UH di cui sopra (2) per generare una seconda linea cellulare stabile capace di produrre RNA antisense diretti contro l'RNA messaggero di CMAH. Cellule CHO-UH sono state trasfettate utilizzando un metodo derivante dal sistema

AP

dell'amplificazione *in vitro* (di cui sopra). In particolare le cellule sono state trasfettate con concatenameri di DNA costituiti da copie multiple della cassetta di espressione per l'RNA antisenso prescelto e copie della cassetta di espressione per l'enzima dhfr in un rapporto circa 10:1. E' stata così ottenuta la linea cellulare CHO-AsUH2 nella quale l'attività CMAH è ridotta del 78% rispetto alla linea di partenza CHO-UH; a tale riduzione di attività enzimatica corrisponde una pari riduzione nella quantità di NeuGc rispetto alla linea parentale (sul totale degli acidi sialici NeuGc passa da $3,7 \pm 0,3\%$ in CHO-UH a $0,62 \pm 0,05\%$ in CHO-AsUH2). La riduzione dell'attività CMAH nella nuova linea cellulare non è totale ed è strettamente collegata alla costante presenza di RNA antisenso all'interno della cellula ossia alla continuità della trascrizione della sequenza codificante per l'RNA antisenso stesso.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Lo scopo della presente invenzione è quello di fornire una linea cellulare CHO che non produca Neu5Gc in seguito all'idrossilazione di Neu5Ac.

La strategia seguita dai presenti inventori è stata quella di modificare geneticamente la linea cellulare CHO in modo da privarla di attività CMP-NeuAc idossilasica e renderla quindi utilizzabile per la produzione di glicoconiugati ricombinanti di interesse terapeutico utilizzabili in terapia umana aventi un minor potenziale immunogenico per l'uomo rispetto a quello dei corrispondenti glicoconiugati prodotti in cellule non modificate geneticamente.

Tale risultato è stato ottenuto eliminando dal genoma della linea cellulare CHO una porzione ben definita del gene che codifica per CMAH, ovvero la

sequenza genica che codifica per il dominio catalitico di CMAH. Più nel dettaglio, è stata eliminata dal genoma della linea cellulare CHO la sequenza genica che codifica per i siti di legame al substrato (l'acido CMP-N-acetilneuramminico) e al cofattore (il citocromo b5).

La delezione di tale sequenza è stata effettuata con il metodo definito del "Knock Out (KO) genico" o "Gene Targeting", descritto ad esempio in (4), (10), (11) e (13), qui incorporati per riferimento.

Si è così ottenuta la delezione di una porzione del gene codificante per CMAH compresa tra parte dell'esone 10 e parte dell'esone 15 (eliminando cioè interamente gli esoni 11, 12, 13 e 14) e, più nel dettaglio, della porzione corrispondente alla sequenza compresa tra le basi 787 e 1598 del cDNA di CMAH e che corrisponde alla porzione del gene codificante per CMAH il cui cDNA ha la sequenza qui sotto riportata:

```
tcctgaaatggacacatgcattatcgtagagtacaaaggtcataaaataactcaacacagt
ggattgcaccagacccaatgggggaaggctgcctgagaaagctgctctaagatgagtga
ttttgctggaggagcatcaggctttccaatgactttcagcggtgaaaatttactgagga
atggaaggcccagttcattaaggcggaaagaagaagcttctgaattācaaagctcagct
cgtgaaggacctccagcctcgaatctactgtccctttgctgggtattttgtggaatctca
tccatctgacaagtataattaaggaaacaaacatcaaaaatgacccgattcaactcaaaa
tctcatcaagaaaaactgtgatgtggtgacatggacccacgacctggagctactcttga
cctgggcaggatgctgaaggacccaacagacagccaggcatcatagagcctccagaagg
gacaaaaatttacaaggattcatgggacttcggccatacctgagcaccttgcactctgc
tgtaggagatgaaatcttccttcaactcgtcctggataaaaagagtacttcaacttgggctgg
atttaagagttacaacttggtggtcaggatgattgaaacagatgaagacttcaacccttt
tcctggagggtatgactatctggtggactttctagatttgtcttttccaaaagaaagacc
aagcaggggagcatccctatgaagaaatccgtagccgtgtggatgtcgtcagggtacgtggt
gaagcacggtctgctgtgggatgacctgtaca
```

Essa corrisponde alla porzione del gene codificante per la sequenza di CMAH compresa tra l'aminoacido 262 e l'aminoacido 532 ed avente la sequenza qui sotto riportata:

```
hpemdtcii veykghkiln tvdctrpngg rlpekaalmm
sdfaggasgf pmtfsggkft eewkaqfika errkllyka
qlvkdllpri ycpfagyfve shpsdkyike tnikndpiql
nnlikknadv vtwtprpgat ldlgrmlkdp tdsqgiiepp
egtkiykdsd dfgpylstlh savgdeiflh sswikeyftw
```

MP

agfkxynlvv rmietdedfn pfpggydylv dfldlsfpke
rpsrehpyee irsrvdvrvy vvkhgllwdd ly

La sequenza del cDNA di CMAH di *Cricetulus griseus* (organismo da cui è stata ottenuta la linea cellulare CHO) utilizzata per gli scopi della presente invenzione, è depositata in banca dati NCBI con numero di accesso AJ242835.

Come verificabile nelle pagine che seguono, tale metodo ha comportato la sostituzione di buona parte della sequenza codificante CMAH con DNA esogeno, ad esempio DNA in grado di conferire resistenza a specifici antibiotici, come ad esempio la zeocina; tale approccio, esteso ad entrambi gli alleli, ha portato ad un silenziamento completo e virtualmente irreversibile del gene codificante CMAH.

MATERIALI E METODI

1) Clonaggio della sequenza 3' flanking per il targeting del gene CMAH

DNA genomico estratto da cellule CHO UH $\alpha 2,6$ ST⁺dhfr⁻ (2) è stato amplificato con i seguenti oligonucleotidi:

| | | |
|-------|-------------------------------------|-----------|
| OL155 | 5' TTGGCTTCCAGACCCGGTTGCAGC 3' | (Forward) |
| OL156 | 5' TTAGAGGGAGTTTATCTGAAAATGATTCC 3' | (Reverse) |

OL155 si appaia ad una sequenza appartenente all'esone 15 del gene CMAH (secondo la numerazione degli esoni riportata per il gene CMAH umano, ved. NCBI, UniGene Hs.24697) e OL156 si appaia ad una regione appartenente all'esone 16. Il frammento da PCR così ottenuto (circa 3,5 kb) è stato purificato da gel e le sue estremità sono state sequenziate con i medesimi oligonucleotidi. E' stata in tal modo evidenziata l'esistenza di un sito SphI in prossimità dell'estremità 5' del frammento e di un sito EcoRI in



prossimità dell'estremità 3'. Mediante digestione del frammento con i suddetti enzimi si è attestata l'unicità dei siti evidenziati tramite sequenziamento. Il frammento in tal modo digerito è stato quindi clonato entro i siti SphI ed EcoRI del vettore pUC18, che porta il gene per la resistenza ad ampicillina, Accession Number NCBI L08752 (15). Dopo trasformazione del ceppo di *Escherichia coli* DH5 α (5) si è ottenuto il plasmide PL238 (figura 1).

La regione clonata è stata interamente sequenziata.

PL238 è stato in seguito modificato per l'inserzione di un sito unico XhoI al posto di EcoRI. In particolare, l'oligonucleotide sintetico OL192, fosforilato in 5':

5' Pho-AAT TGC TCG AGC 3'

è stato sottoposto ad un ciclo di riscaldamento a 95° per 5 minuti/lento raffreddamento (circa 3 ore), in modo da ottenere il seguente oligonucleotide a doppia elica, contenente il sito XhoI:

5' Pho-AATTGCTCGAGC 3'
 3' CGAGCTCGTTA-Pho5'
 XhoI

Tale oligonucleotide è stato clonato nel plasmide PL238 digerito con EcoRI. Dopo trasformazione del ceppo DH5 α si è ottenuto il plasmide PL 265 (figura 2)

Esso differisce da PL238 per la sostituzione del sito unico EcoRI (a valle della sequenza 3' flanking clonata) con un sito unico XhoI.

2) Clonaggio della sequenza 5' flanking per il targeting del gene CMAH

DNA genomico estratto da cellule CHO UH α 2,6 ST⁺dhfr⁻ (2) è stato amplificato con i seguenti oligonucleotidi:

OL178 5' TTAAAGGATCCGCCGAGGATGGTGGTTGCTAC 3'
(Forward) BamHI

OL180 5' CAACTGCAGTCAGGATGAACGCCATCCATCAAG 3'
(Reverse) PstI

OL178 si appaia ad una sequenza appartenente all'esone 8 del gene CMAH e OL180 si appaia ad una regione appartenente all'esone 10. Il frammento da PCR così ottenuto (circa 4,4 kb) è stato digerito con gli enzimi BamHI e PstI (appartenenti agli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione) e clonato entro i medesimi siti di PL42 (derivato dal pUC18 per rimozione da questo del promotore Lac). Dopo trasformazione del ceppo di *E. coli* DH5α è stato ottenuto il plasmide PL244 (figura 3).

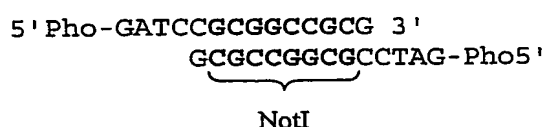
PL244 è stato in seguito modificato per l'inserzione di due siti unici, RsrII e NotI.

In particolare, gli oligonucleotidi sintetici fosforilati in 5' OL193 e OL194 sono stati sottoposti ad un ciclo di riscaldamento a 95° C per 5 minuti/lento raffreddamento (circa 3 ore), in modo da ottenere il seguente oligonucleotide doppia elica, contenente il sito RsrII:

5' Pho-GCGGTCCGCCATG 3'
3' GTACCGCCAGGCG-Pho5'
RsrII

Tale oligonucleotide è stato clonato nel plasmide PL244 digerito con SphI. Il suddetto oligonucleotide sintetico può inserirsi entro il sito SphI in entrambi gli orientamenti ma solo quello rappresentato è utile ai nostri scopi. Dopo trasformazione del ceppo DH5 α è stato estratto il DNA.

plasmidico da più cloni resistenti ad ampicillina. Mediante sequenziamento dei DNA estratti si è riscontrata, come atteso, una frequenza del 50% per ciascuno dei due orientamenti e si è prescelto un clone con l'oligonucleotide inserito nel verso voluto. Il plasmide così ottenuto è stato digerito con BamHI e ligato con il seguente oligonucleotide sintetico a doppia elica fosforilato alle sue estremità 5', ottenuto come visto precedentemente (riscaldamento a 95° e lento raffreddamento):



Si è così ottenuto PL290 (figura 4).

3) Clonaggio delle regioni 3'flanking e 5' flanking nel vettore per il targeting del gene CMAH

Il plasmide PL286, in cui sono state clonate le regioni 3' e 5' flanking, ha la struttura riportata in figura 5 (sono evidenziati i siti unici che verranno in seguito utilizzati).

Tale plasmide si compone dei seguenti elementi:

- scheletro derivante da un vettore appartenente alla famiglia dei plasmidi commerciali pBluescript (Stratagene);
- polylinker di sinistra in cui sono presenti anche un terminatore di trascrizione per cellule eucariotiche e tre STOP codon nei tre possibili frames di lettura;
- un marcatore di selezione positiva Zeo-LacZ, NCBI Accession Number M81126 (1) che conferisce resistenza all'antibiotico Zeocina;

RNR

- un marcatore di selezione negativa TK (thymidine kinase) NCBI Accession Number V00467 (12). Vedi anche NCBI N° AF090451 per plasmide pKOTK di Lexicon Genetics INC. (1998) che conferisce sensibilità al ganciclovir;
- un polylinker di sinistra;
- due siti LoxP, NCBI N° M10289 (6) in grado di ricombinare tra loro grazie all'azione dell'enzima Cre ricombinasi.

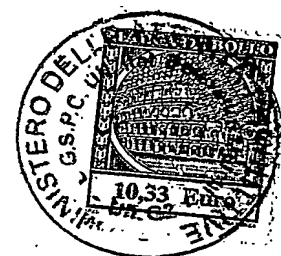
La regione 3' flanking del gene CMAH, excisa dal plasmide PL265 mediante digestione con gli enzimi HindIII e XhoI, è stata clonata entro i medesimi siti di PL286. Si è così ottenuto PL287 (figura 6).

La regione 5' flanking del gene CMAH, excisa dal plasmide PL290 mediante digestione con gli enzimi NotI e RsrII, è stata clonata entro i medesimi siti di PL287. Si è così ottenuto PL292 (figura 7).

4) Trasfezione di cellule CHO $\alpha 2,6\text{-ST}^+$ dhfr⁻ con PL292 e selezione di cloni stabili

5×10^5 cellule CHO $\alpha 2,6\text{-ST}^+$ dhfr⁻ (2) sono state seminate in pozzetto di una piastra multiwell da 6 pozzetti (3,5 ml di coltura per ogni pozzetto) in terreno α -MEM (Gibco) supplementato con 10% Fetal Bovine Serum, Neomicina 0,45mg/ml, Pennicillina 100 unità/ml, Streptomicina 0,1mg/ml. Dopo incubazione di 24 ore a 37°C e 5% CO₂ il terreno è stato sostituito con terreno fresco e si è proceduto alla trasfezione. Sono state allestite le seguenti miscele:

| | | |
|--------|------------------------|-------------|
| Mix A: | NaCl 0,15N | 155 μ l |
| | PEI (Polietilenimmina) | 45 μ l |
| Mix B: | NaCl 0,15N | 190 μ l |



MS

PL292 circolare

10 μ l (15 μ g)

Mix A è stata aggiunta a Mix B e, dopo incubazione di 15 minuti, la miscela finale (400 μ l) è stata dispensata nel singolo pozzetto; la multiwell da 6 è stata quindi centrifugata per 5 minuti a 200xg allo scopo di facilitare il contatto fra i complessi DNA-PEI e lo strato di cellule sul fondo del pozzetto. Dopo una incubazione di 48 ore le cellule sono state staccate con Tripsina (circa 0,75 mg per ogni pozzetto) e trasferite in piastra Petri da 90mm in presenza di terreno addizionato con Zeocina (400 μ g/ml finali) per la selezione di cloni stabilmente resistenti al suddetto antibiotico.

5) Screening per l'identificazione di cloni che hanno subito il targeting del gene CMAH

I cloni stabilmente resistenti alla Zeocina sono stati sottoposti ad uno screening per PCR. Il DNA genomico è stato estratto da coppie di cloni e amplificato con i seguenti primers:

OL232: 5' CATGGACCTCAAGTTGGGAG 3' (Forward)

Tale primer appaia sull'esone 8, a monte della porzione contenuta nella regione 5'flanking clonata nel plasmide PL292 utilizzato per il targeting.

RV Zeo: 5' GGAACGGCACTGGTCAACTT 3' (Reverse)

Tale primer appaia entro la porzione iniziale del gene Zeo-LacZ, marcatore per selezione positiva contenuto nel plasmide PL292.

OL234: 5' TGAAAGTCATTGGAAAGCCTGATG 3' (Reverse)

RP

Tale primer appaia sull'esone 11, che deve risultare mancante nell'allele del gene CMAH che abbia subito il targeting.

La coppia OL232+RV Zeo è stata utilizzata per evidenziare l'evento di targeting avvenuto (amplificazione dell'allele knock out, comparsa di una banda di poco inferiore a 5000 bp); la coppia OL232+ OL234 è stata utilizzata come controllo di amplificabilità del DNA genomico estratto (amplificazione dell'allele nativo, comparsa di una banda di poco superiore a 5000 bp). E' stato in tal modo evidenziato un clone che ha subito il targeting di un solo allele CMAH (clone eterozigote)

6) Trattamento del clone eterozigote con Cre-ricombinasi e targeting del secondo allele CMAH

Il clone eterozigote è stato trasfettato transientemente con il plasmide pTURBO-Cre, NCBI Accession Number: AF334827 (figura 8).

Dopo un opportuno periodo di incubazione, le cellule così trattate sono state poste in presenza di Ganciclovir. Tale molecola, in presenza dell'enzima codificato dal gene TK, è convertita in un composto tossico per le cellule. La perdita del gene TK in seguito alla ricombinazione tra i siti LoxP permetterebbe alle cellule di sopravvivere. I DNA genomici dei cloni risultati resistenti a tale antibiotico sono stati amplificati per PCR con primers in grado di evidenziare l'avvenuta ricombinazione tra i siti LoxP. E' stato quindi prescelto un clone in cui tale ricombinazione si è verificata ed è stato sottoposto ad un secondo ciclo di trasfezione con PL292 per il targeting del secondo allele (vedi capitoli 4 e 5), seguito da un ciclo di trasfezione transiente con pTURBO-Cre al fine di ottenere un clone in cui:

- 1) entrambi gli alleli del gene CMAH abbiano subito il targeting;

MP

- 2) siano state eliminate le sequenze utilizzate per la selezione positiva (Zeo-LacZ) e negativa (TK).

Il ceppo ottenuto verrà in seguito sottoposto a saggi biochimici allo scopo di quantificare NeuAc e NeuGc in glicoproteine cellulari e/o ricombinanti.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

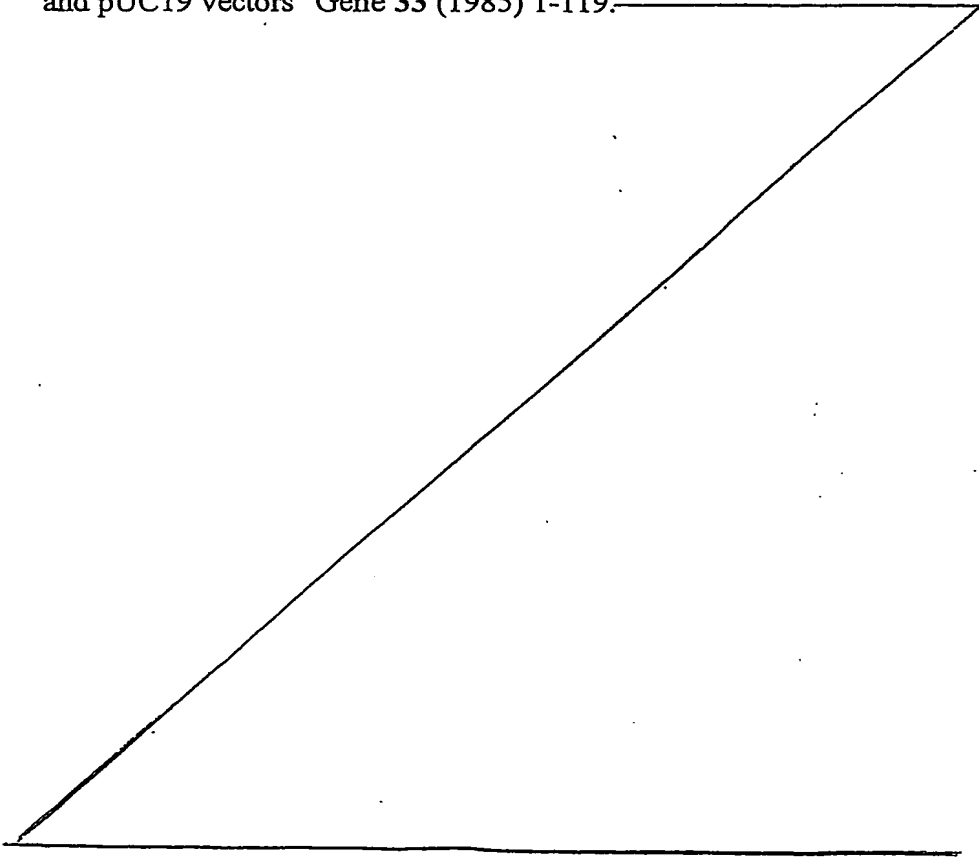
1. Baron M, Reynes JP, Stassi D and Tiraby G "A selectable bifunctional beta-galactosidase::phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells" *Gene* 114 (1992) 239-243.
2. Bragonzi A, Distefano G, Buckberry LD, Acerbis G, Foglieni C, Lamotte D, Campi G, Marc A, Soria MR, Jenkins N and Monaco L "A new Chinese hamster ovary cell line expressing alpha2,6-sialyl transferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins" *Biochim Biophys Acta* 1474 (2000) 273-82.
3. Chenu S, Gregoire A, Malykh Y, Visvikis A, Monaco L, Shaw L, Schauer R, Marc A, and Goergen JL "Reduction of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in engineered Chinese hamster ovary cells using an antisense-RNA strategy" *Biochim. Biophys. Acta* 1622 (2003) 133-144.
4. Galli-Taliadoros LA, Sedgwick JD, Wood SA and Korner H "Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice" *J. Immunol. Methods* 181(1995) 1-15.
5. Hanahan D "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids" *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 557-580.

M

6. Hoess RH, Ziese M and Sternberg N "P1 site specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (1982) 3398-3402.
7. Hokke CH, Bergwerff AA, van Dedem GW, van Oostrum J, Kamerling JP and Vliegthart JF "Sialylated carbohydrate chains of recombinant human glycoproteins expressed in Chinese hamster ovary cells contain traces of N-glycolylneuraminic acid" FEBS Lett. 275 (1990) 9-14.
8. Hubbard SC, Walls L, Ruley HE and Muchmore EA "Generation of Chinese Hamster Ovary Cells Glycosylation Mutants by Retroviral Insertional Mutagenesis" The Journal of Biol. Chem. 269 (1994) 3717-3724.
9. Moremen KW "Golgi alpha-mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals" Biochim Biophys Acta. 1573 (2002) 225-235.
10. Smith CM "Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function" The Scientist 14 (2000) 32-36.
11. Sternberg N, Sauer B, Hoess R and Abremski K "Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation" J. Mol. Biol. 20 (1986) 197-212.
12. Wagner MJ, Sharp JA and Summers WC "Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 (1981) 1441-1445.



MP

13. Warner TG "Enhancing therapeutic glycoprotein production in chinese hamster ovary cells by metabolic engineering endogenous gene control with antisense DNA and gene targeting" *Glycobiology* 9 (1999) 841-850.
 14. Weikert S, Papac D, Briggs J, Cowfer D, Tom S, Gawlitzek M, Lofgren J, Mehta S, Chisholm V, Modi N, Eppler S, Carrol K, Chamow S, Peers D, Berman P and Krummen L "Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins" *Nature Biotechnology* 17 (1999) 1116-1121.
 15. Yanisch-Perron C, Vieira J and Messing J "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors" *Gene* 33 (1985) 1-119.
- 

RIVENDICAZIONI

1. Una cellula della linea cellulare CHO caratterizzata dall'essere priva di una porzione del gene codificante per CMAH.
2. Una cellula della linea cellulare CHO caratterizzata dall'essere priva della porzione del gene codificante per il dominio catalitico di CMAH.
3. Una cellula secondo la rivendicazione 1-2 caratterizzata dal fatto di essere priva della sequenza genica che codifica per i siti di legame al substrato (l'acido CMP-N-acetilneuramminico) e al cofattore (il citocromo b5).
4. Una cellula secondo le rivendicazioni 1-3 caratterizzata dal fatto di essere priva di una porzione del gene codificante per CMAH compresa tra parte dell'esone 10 e parte dell'esone 15.
5. Una cellula secondo le rivendicazioni 1-4 caratterizzata dal fatto di essere priva della porzione del gene codificante per CMAH corrispondente alla sequenza compresa tra le basi 787 e 1598 del cDNA di CMAH.
6. Una cellula secondo la rivendicazione 5 caratterizzata dal fatto di essere priva della porzione del gene codificante per CMAH il cui cDNA ha la seguente sequenza:

```
tcctgaaatggacacatgcattatcgtagagtacaaagggtcataaaatactcaacac
agtggattgcaccagacccaatgggggaaggctgcctgagaaagctgctctaataatgat
gagtgatTTTTGCTGGAGGAGCATCAGGCTTTCCAATGACTTTCAGCGGTGGAAAATT
tactgaggaatggaaggccagttcattaaggcggaagaagaagcttctgaatta
caaagctcagctcgtgaaggacctccagcctcgaatctactgtccctttgctgggta
TTTTGTGGAATCTCATCCATCTGACAAGTATATTAAGGAAACAAACATCAAAAATGA
cccgattcaactcaacaatctcatcaagaaaaactgtgatgtggtgacatggacccc
acgacctggagctactcttgacctgggcaggatgctgaaggacccaacagacagcca
gggcatcatagagcctccagaagggaacaaaatttacaaggattcatgggacttcgg
cccatacctgagcaccttgcaactctgctgtaggagatgaaatcttccttcactcgtc
ctggataaaagagtacttcacttgggctggatttaagagttacaacttggtgggtcag
gatgattgaaacagatgaagacttcaacccttttcctggagggtatgactatctgggt
ggactttctagatttgtcttttccaaaagaagaccaagcaggagcatccctatga
```

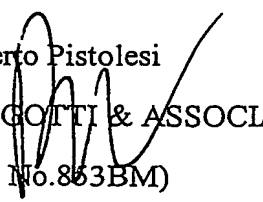
agaaatccgtagccgtgtggatgtcgtcaggtacgtggtgaagcacggtctgctgtg
ggatgacctgtaca

7. Una cellula secondo la rivendicazione 5 caratterizzata dal fatto di essere priva della porzione del gene codificante per la sequenza di CMAH compresa tra l'aminoacido 262 e l'aminoacido 532.
8. Una cellula secondo la rivendicazione 5 caratterizzata dal fatto di essere priva della porzione del gene codificante per la porzione di CMAH avente la seguente sequenza:

hpemdtcii veykghkiln tvdctrpngg rlpekaalmm
sdfaggasgf pmtfsggkft eewkaqfika errkllyka
qlvkdlqpri ycpfagyfve shpsdkyike tnikndpiql
nnlikkncdv vtwtrprgat ldlgrmlkdp tdsqgiepp
egtkiykdsd dfgpylstlh savgdeiflh sswikeyftw
agfksynlvv rmiетdedfn pfpggydylv dflldlsfpke
rpsrehpyee irsrvdvvy vvkhgllwdd ly

9. Una cellula secondo le rivendicazioni 5-8 caratterizzata dal fatto che il numero di accesso NCBI di detto cDNA è AJ242835.
10. Una cellula secondo le rivendicazioni 1-9 caratterizzata dal fatto che tale porzione del gene codificante per CMAH è assente da entrambi gli alleli.
11. Una cellula secondo le rivendicazioni 1-10 caratterizzata dal fatto che la sequenza genica eliminata è sostituita con almeno una sequenza di DNA codificante per la resistenza ad un antibiotico.
12. Una cellula secondo la rivendicazione 11 caratterizzata dal fatto che detto antibiotico è la zeocina.
13. Uso di una cellula secondo le rivendicazioni 1-12 quale ospite nell'espressione di proteine ricombinanti eterologhe.
14. Uso secondo la rivendicazione 13 nella produzione di glicocongiugati ricombinanti.

Il Mandatario


Dott. Roberto Pistolesi
della DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL
(Iscr. Albo No. 863BM)

RP/ac

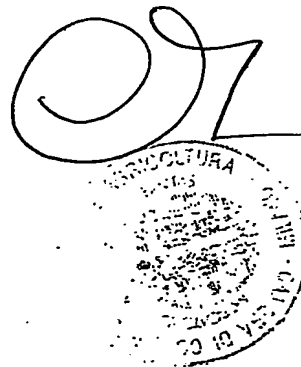
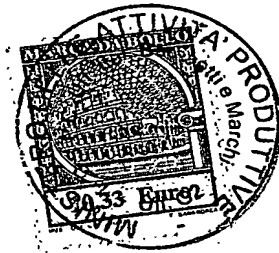


Figura 1

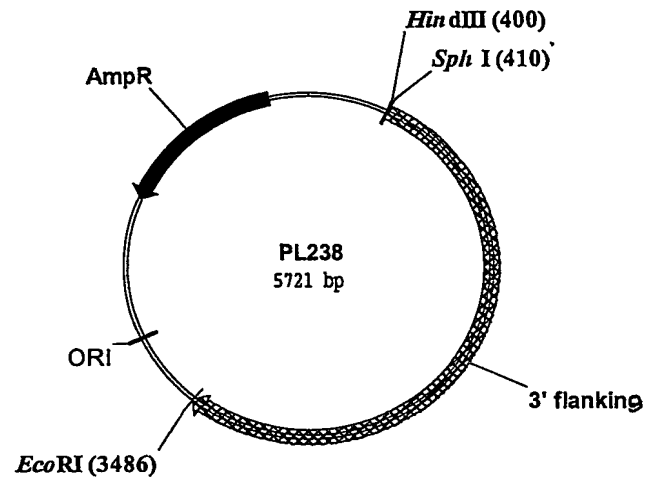


Figura 2

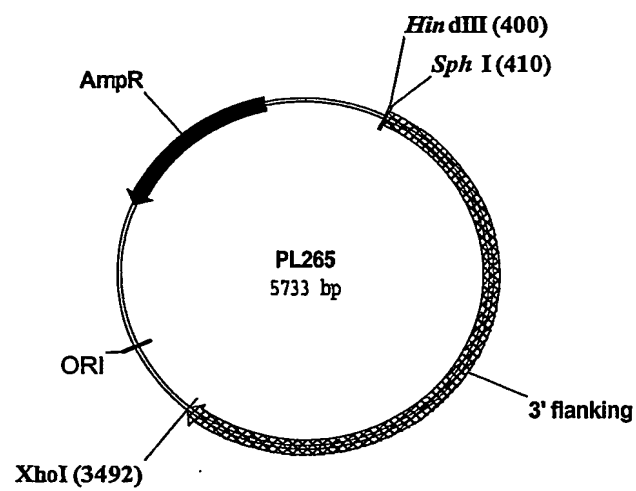


Figura 3

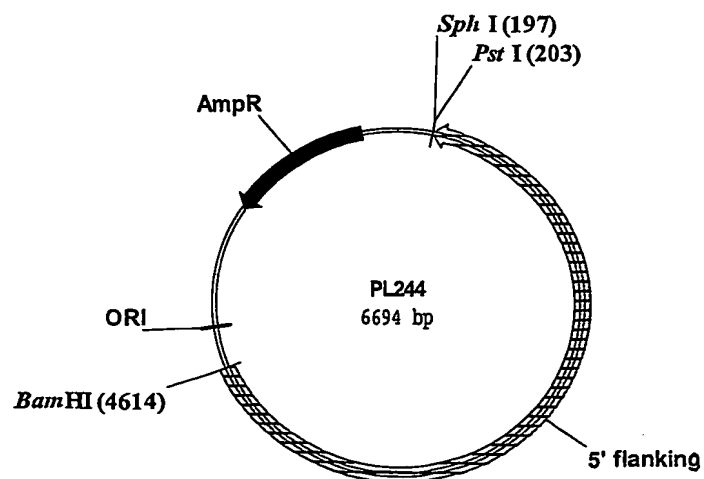


Figura 4

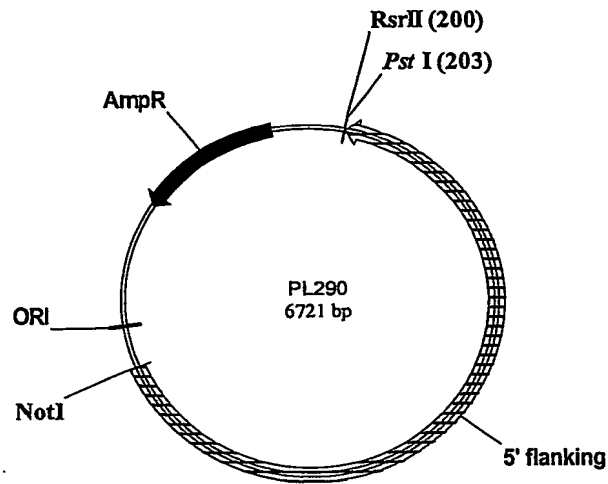


Figura 5

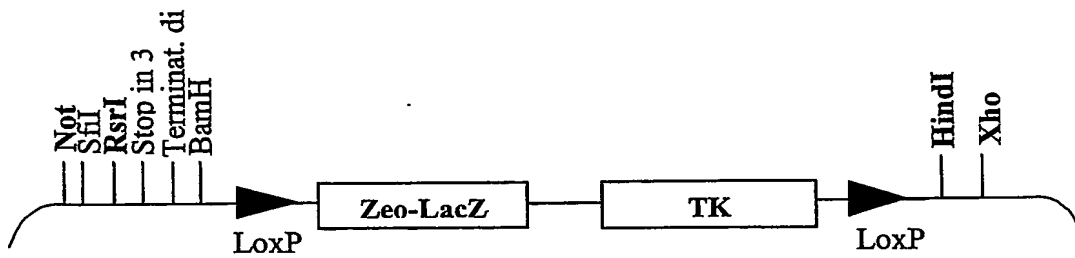


Figura 6

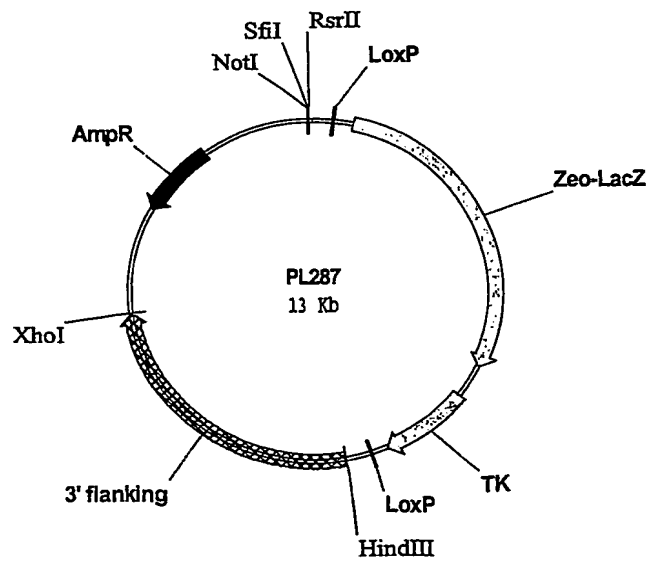


Figura 7

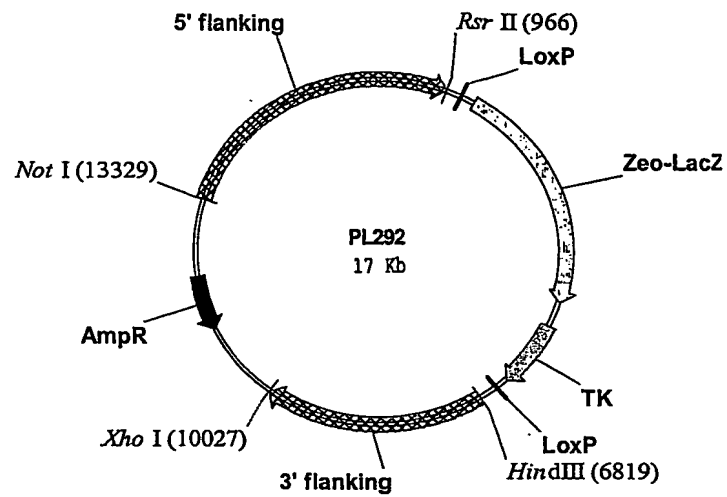
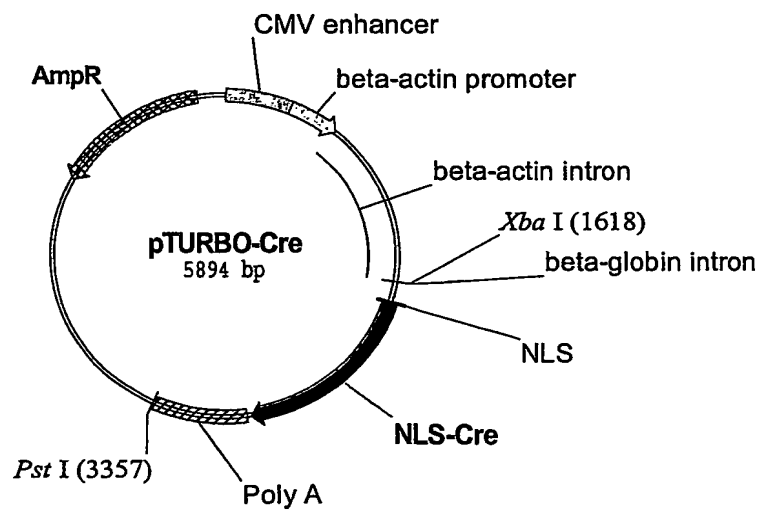


Figura 8



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.